

Phân tích QTL tính trạng chống chịu khô hạn trên cây lúa *Oryza sativa* L.

Nguyễn thị Lang¹, Trịnh thị Lũy¹, Bùi thị Dương Khuyề¹, Nguyễn hoàng Hân¹
và Bùi Chí Bửu²

¹Viện Lúa Đồng bằng Sông Cửu Long

²Viện Khoa Học Kỹ Thuật Nông Nghiệp Miền Nam

Email : ntl@hcm.vnn.vn, buichibuu@hcm.vnn.vn

English Abstract

Quantitative trait loci influencing drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L).

SSR technique combined with selective genotyping was used to map quantitative trait loci (QTLs) associated with tolerance for drought tolerance in rice. Two hundred twenty nine (BC₂F₂) derived from the cross between OM1490 / WAB880-1-38-18-20-P1-HB were evaluated. BC lines were evaluated for drought at flowering (DRF), dry root weigh (DR), root length (RL). Microsatellite map of this population was used with 232 markers to detect the linkage to target traits. A linkage map was constructed from 12-linkage groups based on the population. The map covers 2,553.7 cM with an average interval of 10.97 cM between marker loci. Markers associated with drought tolerance were located mostly on chromosomes 2, 3, 4, 8, 9, 10 and 12. Quantitative trait loci (QTL) mapping was used to determine effects of QTLs associated with drought tolerance traits. We also mapped QTLs for morphological attributes drought tolerance. Chi-square tests (χ^2), single maker analysis (SMA), interval mapping (IM) were combined in QTL analysis procedure. All approaches are similar to QTL detection result. Fine QTLs were identified for DRR, two QTLs for length root, two QTLs for dry root weight. The proportion of phenotypic variation explained by each QTL ranged from 20.73% to 30.766% for DR, and from 6.23 to 3.39% for morphological characters at drought flowering. This study has provided much more detailed informations on the relative importance marker assisted selection of drought tolerance.

Tóm tắt

Thiết lập bản đồ QTL điều khiển chống chịu khô hạn trên quần thể BC₂F₂ từ tổ hợp lai OM1490 / WAB 880-1-38-20-P1-HB. Bản đồ đã sử dụng 234 SSR đa hình phủ trên 12 nhiễm sắc thể. Tổng chiều dài là 2.553,7cM. Khoảng cách trung bình giữa hai marker là 10,97cM. Đánh giá kiểu hình được tập trung vào ba tính trạng: chống chịu hạn vào thời kỳ trổ hoa, chiều dài của rễ, khối lượng khô của rễ. Bản đồ QTL giả định liên kết với gen chống chịu khô hạn thể hiện trên các nhiễm sắc thể số 2, 3, 4, 8, 9, 10 và 12 với LOD >3,0. Bản đồ “fine mapping” cũng được thiết lập, tập trung trên nhiễm sắc thể số 9 nhằm xác định chỉ thị phân tử có thể sử dụng cho việc chọn lọc dòng chống chịu hạn. Biến thiên kiểu hình được giải thích 20,73-30,76% đối với QTL điều khiển tính trạng khối lượng khô của rễ, 3,39-6,23% đối với điểm chịu hạn ở giai đoạn trổ.

I. Tổng quan

Khô hạn là yếu tố chính làm giảm năng suất của lúa (*Oryza sativa* L.), dưới điều kiện canh tác nước trời (rainfed) và sự kiện thiếu nước tưới ngày càng nghiêm trọng hơn ở vùng có nước tưới cũng như vùng lúa rẫy. Người ta tập trung sự chú ý vào đối tượng khô hạn và mặn, hai dạng gây stress phi sinh học quan trọng đối với sản xuất lúa, và đặt ra mục tiêu hướng tới để cải tiến giống lúa trên qui mô toàn cầu. Khô hạn sẽ là yếu tố quan trọng bậc nhất ảnh hưởng đến an ninh lương thực của thế giới, nó có thể làm giảm 70% năng suất cây trồng nói chung

(Bray và ctv. 2000). Sự khan hiếm về nước tưới phục vụ cho nông nghiệp đã được báo động trong nhiều hội nghị khoa học của thế giới gần đây. Sản xuất lúa nước ở Việt Nam không phải là ngoại lệ.

Sử dụng biện pháp chọn tạo giống lúa chống chịu khô hạn bằng chỉ thị phân tử (MAS) đã được thảo luận trong nghiên cứu này. Chọn giống truyền thống chống chịu khô hạn là cách tiếp cận rất cơ bản trong một thời gian dài, một vài thành công đã được ghi nhận trên cây ngô (Hoisington và ctv. 1996), cây lúa (Zhang và ctv. 2006), cây lúa mì (Zhao và ctv. 2000). Tuy nhiên, một lỗ hổng lớn giữa các mức độ chống chịu hạn vẫn chưa được xác định trong hầu hết các loài cây trồng. Đặc biệt là sự ổn định về năng suất vô cùng nhạy cảm với sự thiếu nước (Xiao và ctv. 2007). Đáp ứng lại hiện tượng stress do khô hạn, cây trồng có một cơ chế rất tiến bộ từ việc nhận tín hiệu đến truyền nó đi vào hệ thống tinh vi của tế bào, kích thích hoạt động của gen mục tiêu (Thomashow 1999; Xiong và ctv. 2002). Chống chịu khô hạn là tính trạng cực kỳ phức tạp, bị ảnh hưởng bởi sự thể hiện đồng thời cả một hệ thống gen mục tiêu (Thomashow 1999; Xiong và ctv. 2002) và bị ảnh hưởng bởi các yếu tố về môi trường, vật lý, hóa học (Soltis và Soltis 2003). Điều này làm cho những tiến bộ nhất định về cải biến di truyền tính chống chịu khô hạn xảy ra rất chậm chạp. Sự phát triển nhanh chóng của ngành genome học chức năng và công nghệ sinh học trong thời gian gần đây đã cung cấp cho các nhà khoa học cơ hội mới để cải tiến tính trạng chống chịu khô hạn.

Chiến lược có hiệu quả đã được ghi nhận là làm gia tăng lượng đường dễ hòa tan, các hợp chất cần thiết thông qua tiếp cận với kỹ thuật chuyển nạp gen. Những hợp chất đó là: proline, trehalose, betaine và mannitol, đóng vai trò như những thể bảo vệ thẩm thấu (osmoprotectants); trong vài trường hợp, chúng ổn định được các phân tử chức năng dưới điều kiện bị stress (Kishor và ctv. 1995; Hayashi và ctv. 1997; Shen và ctv. 1997; Garg và ctv. 2002). Protein LEA (late embryogenesis abundant) cũng được chú ý trong điều kiện bị stress do thiếu nước (Xu và ctv. 1996; Maqbool và ctv. 2002; Goyal và ctv. 2005). Protein LEA được phân chia thành 5 nhóm chính trên cơ sở chuỗi trình tự amino acid của nó (Bake và ctv. 1988; Dure và ctv. 1989) và chúng được xét nghiệm lại thông qua công cụ tin sinh học (Wise 2003). Những protein như vậy đã đóng góp phần nào vào sự tiến hóa của nhóm protein có tên gọi là “hydrophilins” khi chúng đáp ứng với điều kiện thẩm thấu cực trọng (hyperosmotic) (Garay-Arroyo và ctv. 2000). Vai trò chính của protein LEA là hoạt hóa những amino acid ưa nước và đã nạp năng lượng. Sự thể hiện của các gen *LEA* thường xảy ra dưới dạng abscisic acid độc lập. Nó không những chỉ được phát hiện trong hạt mà còn trong các mô tăng trưởng khi cây bị stress do thiếu nước, do mặn, và do lạnh (Ingram và Bartels 1996; Thomashow 1998; Cuming 1996; Grelet và ctv. 2005). Sự thể hiện của protein LEA và đặc điểm cấu trúc đại phân tử của nó cho thấy vai trò bảo vệ cây chống chịu sự kiện mất nước (Ingram và Bartels 1996). Mặc dù chúng ta có nhiều số liệu về cấu trúc và sự thể hiện của protein này, nhưng rất ít công trình đề cập đến thao tác của các gen *LEA* nhằm cải tiến tính chống chịu khô hạn trong điều kiện đồng ruộng (Raynal và ctv. 1999; Ndong và ctv. 2002; Grelet và ctv. 2005, Xiao và ctv. 2007). Thí dụ, gen *HVA1* mã hóa nhóm protein 3 LAE của cây lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.). Người ta đã chuyển nạp gen này thành công vào cây lúa để tăng cường tính chống chịu khô hạn và chống chịu mặn, chỉ trong điều kiện ở nhà lưới (Xu và ctv. 1996). Một clone cDNA có độ dài phân tử đầy đủ chứa gen *LEA* nhạy cảm với stress do mặn và gen *OsLEA3-1* đã thể hiện tính chống chịu khô hạn trong điều kiện đồng ruộng, nhờ promoter *HVA1-like* và promoter kiến trúc *CaMV35S* (Xiao và ctv. 2007). Đây có thể nói là sự kiện nổi bật trong thời gian gần đây, nhờ kết quả của thí nghiệm đồng ruộng mang lại.

Số QTL được tìm thấy đối với tính trạng chống chịu khô hạn thường thay đổi từ 1 đến 4 đối với một tính trạng thuộc thành phần trong sự kiện chống chịu hạn, và những QTL này thường trải rộng trên toàn bộ genome với nhiều nhóm liên kết gen. Thí dụ, tính trạng WUE (hiệu quả sử dụng nước) được tìm thấy với rất ít QTL, từ 4 đến 5 trong genome cây đậu nành (Milan và ctv 1998).

Hệ thống rễ phát triển tốt là một tính trạng vô cùng quan trọng giúp cây trồng chống chịu khô hạn (cơ chế thoát hạn = drought avoidance mechanism). Người ta đã sử dụng quần thể đơn bội kép (DH) của cặp lai IR64 x Azucena tại Viện Lúa Quốc Tế (IRRI). Sau đó Shen và ctv. (1999) đã phát triển quần thể gần như đẳng gen (NIL) của IR64 được du nhập với những QTL chủ lực. Các tác giả đã ghi nhận bốn đoạn trên nhiễm sắc thể số 1, 2, 7, và 9 là nơi định vị các QTL chủ lực trong phân tích chọn lọc từng QTL mục tiêu. Người ta thực hiện nhiều cặp lai giữa các cây BC₃F₂ mang những đoạn mục tiêu của vật liệu cho gen điều khiển rễ lúa phát triển tốt, để loại trừ ảnh hưởng di truyền theo kiểu “genetic drag” và ảnh hưởng các QTL mục tiêu khác nhau chồng lấp theo hình tháp (Shen và ctv. 1999).

Tại Đại học Texas Tech, Zhang và ctv. (1999) đã thực hiện bản đồ di truyền QTL đối với 2 tính trạng quan trọng liên quan đến sự kiện chống chịu khô hạn, đó là: khả năng điều tiết áp suất thẩm thấu (OA), và những tính trạng hình thái của rễ lúa.

Quần thể lúa đã được sử dụng trước đây để lập bản đồ QTL tính trạng OA là:

Quần thể cận giao tái tổ hợp (RIL) của tổ hợp lai CO39 / Moroberekan, với 1 QTL (Lilley và ctv. 1996)

Quần thể đơn bội kép (DH) của tổ hợp lai CT9993 / IR62266, với 4 QTL (Zhang và ctv. 1999)

Quần thể cận giao tái tổ hợp (RIL) của tổ hợp lai CO39 / Moroberekan, với 5 QTL (Lilley và ctv. 1996)

Quần thể lúa đã được sử dụng để lập bản đồ QTL tính trạng tích lũy ABA là: quần thể F₂ của tổ hợp lai IR20 / 63-83, với 10 QTL (Quarrie và ctv. 1997)

Zhikang Li và ctv. (CAAS, IRRI) đã sử dụng 260 vật liệu (trong đó có OM1723 của Việt Nam) từ 15 quốc gia để thực hiện hồi giao với IR64 và Teqing. Họ thanh lọc tính chống chịu khô hạn của 215 quần thể BC₁F₁, và 4.677 dòng lai cận giao (Ils) để nghiên cứu sự biến thiên di truyền chưa được biết (CGV: cryptic genetic variation) của gen chống chịu khô hạn thông qua phân tích QTL (Bửu 2005).

Purwantomo và ctv. khai thác vai trò của các gen có tính chất “homeobox” để phát triển giống lúa chống chịu khô hạn.

Trong khi đó, nhóm nghiên cứu của CIRAD, Pháp, tập trung nghiên cứu đặc tính của rễ lúa thích nghi với sự phát triển (E Guiderdoni). Sự phát triển hệ thống rễ lúa tương thích với stress đã được nghiên cứu và so sánh với cây *Arabidopsis thaliana*. Một array biểu thị clone có qui mô 22 K đối với áp suất thẩm thấu và stress do mặn (SSH), một receptor đặc biệt và một oligo đóng vai trò chuyển mã đã được xác định. Họ phát hiện ra gen mục tiêu có liên quan đến rễ lúa trong điều kiện bị stress.

Giao Sư Ray Wu, ĐH Cornell, Mỹ, đã phát triển 3 dòng lúa chuyển gen: (1) gen tổng hợp proline p5cs, (2) gen choline oxidase COX, (3) dung hợp cả hai gen TPS và TPP trong tổng hợp trehalose. Gorantla và ctv. nghiên cứu phổ thể hiện các gen điều khiển tính chống chịu khô hạn với nhiều gen mục tiêu đã được phát hiện (Bửu 2005)

Toojinda và ctv. thực hiện bản đồ QTL điều khiển tính trạng chống chịu khô hạn tại Thái Lan, với các tính trạng mục tiêu: năng suất hạt, sinh khối, chỉ số thu hoạch HI, số hạt chắc và lép, số hạt / bông, tỉ lệ bất thụ, trọng lượng 1000 hạt, số bông, số chồi, chiều cao, số ngày từ gieo đến trổ, v.v.. QTL định vị trên các nhiễm sắc thể 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 đã được phân tích, trên cơ sở quần thể DH của tổ hợp lai IR62266 / CT9993 tại 3 địa điểm khác nhau trong 3 năm liên tục. Đặc biệt chú ý nhiễm sắc thể số 3 và số 5, nó tập hợp nhiều QTL có liên quan đến tính chống chịu khô hạn (Bừu 2005)

Hiện tượng nông học WUE trong cây lúa đã được Karaba và ctv. (2007) nghiên cứu khá hệ thống với sự thể hiện của gen *HRD* chuyển nạp từ *Arabidopsis*. Cây lúa chống hạn tiêu thụ nước ít biểu thị sự kiện sinh khối rễ tăng lên trong điều kiện có tưới trở lại. Gen *HDR* với yếu tố chuyển mã AP2/ERF, được phân lập trong dòng đột biến của *Arabidopsis* (theo kiểu gắn thêm chức năng) *hrd-D*, điều khiển tính trạng sức mạnh của rễ, sự phân nhánh, tế bào biểu bì, độ dày của lá với tỷ lệ lục lạp tăng cao trong tế bào mesophyll, làm thúc đẩy hiện tượng đồng hóa quang hợp và hiệu suất quang hợp (Karaba và ctv. 2007)

Đặc biệt, Wang và ctv. (2007) đã so sánh sự thể hiện gen giữa giống lúa nước và giống lúa cạn trong điều kiện bị stress do khô hạn, sử dụng phương tiện cDNA microarray. Giống lúa cạn IRAT109, Haogelao, Han 297 và giống lúa nước Zhongzuo 93, Yuefu, Nipponbare đã được sử dụng. Sau khi đọc chuỗi trình tự DNA, có 64 unique ESTs thể hiện ở mức độ cao ở giống lúa cạn và 79 ở giống lúa nước. Tác giả dự đoán sự thể hiện của các gen mục tiêu ở mức độ cao trong lúa cạn có thể cải tiến được khả năng chống chịu stress do khô hạn trong lúa nước và những loài cây trồng có liên quan gần về huyết thống (Wang và ctv. 2007)

Mục tiêu nghiên cứu:

Chọn tạo giống lúa chống chịu khô hạn trên cơ sở bản đồ di truyền QTL và chỉ thị phân tử

Mục tiêu nghiên cứu cụ thể

- Xác định tính đa hình DNA của vật liệu lai trong ngân hàng gen của Viện Lúa ĐBSCL
- Xác định chỉ thị phân tử liên kết với QTL điều khiển chống chịu khô hạn, tập trung chủ yếu trên nhiễm sắc thể số 9.
- Chọn được dòng lúa mang gen chịu hạn thông qua phương pháp hồi giao (BC)

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguồn vật liệu được sử dụng làm bố, chịu hạn *WAB880-1-38-18-20-P1-HB*, WAB881 SG9, IR65195-3B-2-2-2-2 có nguồn gốc từ Viện lúa Quốc Tế.

Nguồn vật liệu được sử dụng làm mẹ: OM1490, OM4495 có nguồn gốc từ Viện lúa ĐBSCL. Thực hiện lai hồi giao tạo quần thể BC₂F₂ để thiết lập bản đồ

Đánh giá kiểu hình

Thí nghiệm được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên, ba lần lặp lại. Các nghiệm thức được trồng ngoài đồng với diện tích 700 m², khoảng cách cây 20 x 20 cm, đánh dấu cẩn thận từng dòng. Hai tuần đầu sau khi cấy, điều chỉnh nước tưới cho lúa thích nghi với điều kiện khô hạn dần dần. Sau đó, không bơm nước, lúa được cung cấp nước bằng sương qua đêm cho tới khi lúa chín.

Chăm sóc và quan sát các dòng mạ, loại bỏ các dòng chết (nếu có). Tiếp tục quan sát các dòng lúa khi đem ra cấy cho đến khi lúa chín, ghi lại ngày quan sát và các dòng bị chết.

Đánh giá các chỉ tiêu nông học, năng suất và thành phần năng suất dựa trên chỉ tiêu của IRRI (SES 1996), tính trạng theo dõi bao gồm: cấp độ cuộn lá (lá cuộn ở giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng), cấp độ khô lá: lá khô ở giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng, khả năng thụ tinh của hạt lúa ở giai đoạn sinh trưởng sinh thực, đánh giá kiểu hình cây (PA).

Phân tích thống kê trên SAS, NTSYSpc.

Đánh giá kiểu gen

Thiết lập bản đồ SSR biểu thị sự liên kết nhóm trên nhiễm sắc thể, sử dụng MAPMARKER (Lander và 1987). Sử dụng 234 SSR đa hình phủ trên 12 nhiễm sắc thể.

III. Kết quả và thảo luận

Sự thể hiện tính chống chịu khô hạn được quan sát thông qua những tính trạng cụ thể như hình thái rễ cây, lá, chồi thân, phản ứng co nguyên sinh, bao phấn, quá trình trở bông. Kết quả dựa trên các chỉ tiêu nói trên. Ba giống WAB880-1-38-18-20-P1-HB, WAB881 SG9, IR65195-3B-2-2-2-2 có nguồn gốc từ Viện lúa Quốc Tế được dùng làm bố. Giống OM1490 được dùng làm mẹ. Cả ba giống làm bố đều biểu hiện cấp 1-3 sau 30 ngày thanh lọc khô hạn. Đối chứng kháng Azucena biểu thị cấp 1. Giống OM1490 được ghi nhận nhiễm cấp 7

Khi phân tích quần thể OM1490 / WAB880-1-38-18-20-P1-HB ở thế hệ F_1 , có 86,6% cá thể nghiêng lệch về bố và 15,3% nghiêng lệch về mẹ OM1490 (cấp 7). Trong thế hệ F_2 , cá thể con lai biểu hiện cấp 1 vẫn chiếm cao hơn 62,2% so với cá thể biểu hiện ở cấp 5 và cấp 7. Ở thế hệ F_3 , số cá thể con lai diễn biến như sau : cấp 1 và cấp 7 giảm, cấp 5 tăng lên.

Trong quần thể lai hồi giao, số cá thể của thế hệ BC_1 và BC_2 biểu thị cấp 1 cao hơn số cá thể biểu hiện trong F_2 và F_3 , nhưng vẫn thấp hơn F_1 .

Trong quần thể con lai OM1490 / WAB881 SG9 ; cá thể của thế hệ con lai cho phân ly nghiêng lệch về tính chống chịu cấp 3. Trong thế hệ F_2 , số cá thể biểu thị cấp 1 chiếm 62,2%. Tuy nhiên trong F_1 , số cá thể nghiêng lệch theo bố là 53,33% và nghiêng lệch theo mẹ (cấp 7) chiếm 46,6%. Số cá thể ở thế hệ F_2 nghiêng lệch theo bố về chống chịu khô hạn là 64,4%. Số cá thể ở F_3 nghiêng lệch theo bố về chống chịu khô hạn giảm xuống còn 44,4%. Con lai ở các thế hệ trung gian lại tăng lên 46,66%.

Phân tích cấp độ chống chịu khô hạn trên các cặp lai BC

Quan sát các giá trị trung bình của các thế hệ được ghi nhận trên tổ hợp OM1490 / WAB880-1-38-18-20-P1-HB, hầu hết cá thể biểu thị cấp 1 chống chịu khô hạn ở BC_1 đạt 86,6%. Tuy nhiên, sang thế hệ BC_2 , biểu hiện này suy giảm. Riêng đối với quần thể BC_1F_2 , các cá thể biểu hiện tính chống chịu khô hạn chiếm 65%. Tuy nhiên, biến thiên trong thế hệ phân ly của BC_2F_2 phân bố khá rõ từ cấp 0 cho tới cấp 9. Quần thể con lai đang phân ly có xu hướng nghiêng lệch về mẹ nhiều hơn bố (nghiêng về bố chiếm 2,18%, nghiêng về mẹ 15,18%). Tần suất phân ly trong quãng giữa bố mẹ là 73,36%, phân ly vượt trội theo hướng bất lợi là 8,2%, phân ly vượt trội theo hướng có lợi là 0,04%

Đối với tính trạng héo lá, trong quần thể BC, cá thể biểu hiện chống chịu khô hạn nghiêng về bố là 13,97%, vượt trội so với bố mẹ là 4,8%. Còn lại dị hợp tử có tần suất là 70,30%.

Đánh giá tính trạng chiều dài rễ của các giống lúa chịu khô hạn : Đối với các dòng có khả năng chống chịu khô hạn, và có khả năng rễ mọc dài, biến thiên từ 26cm tới 10cm (30 ngày sau khi cấy). Khả năng vượt trội so với bố mẹ rất thấp 0,04% (so với bố AB880-1-38-18-20-P1-HB); ghi nhận vượt trội so với mẹ là 20,6%.

Phân tích tỉ lệ bất thụ trên quần thể cặp lai phân tích tỉ lệ thụ trên quần thể ghi nhận nghiên về bố chiếm 6,69%, nghiêng về mẹ 3,12%, Khả năng vượt trội theo hướng có lợi là 2,2% và bất lợi là 2,37%. Dị hợp tử đạt 61,60%. Sự khác biệt về kiểu gen của tính trạng rễ mọc sâu, khả năng thụ tinh, sự nảy mầm hạt phấn, hiện tượng trở thoát cổ bông, sự mở bao phấn đã được các nhà khoa học của IRRI quan tâm, đặc biệt trong đánh giá kiểu hình, với hiện tượng đối trọng nhau giữa hàm lượng ABA do khô hạn kích thích với hàm lượng GA khi lúa trở bông. Phân tích ở mức độ proteomic và transcriptomic cho thấy: người ta có thể phân biệt sự thay đổi có tính chất một chiều hoặc hai chiều của hiện tượng thể hiện gen. Trong lúa mì và lúa mạch, người ta sử dụng phân tích sinh tổng hợp fructan để xem xét tính chống chịu khô hạn ở giai đoạn trở bông; tuy nhiên cây lúa không tích tụ fructan trong thời kỳ này (Bửu và Lang 2003).

Như vậy cả bốn tính trạng ghi nhận trên quần thể BC₂F₂ đều biểu thị sự biến thiên theo phân bố chuẩn. Việc chọn cá thể theo hướng có lợi rất thấp (2,00-6,69%). Do đó, cần tìm ra chỉ thị phân tử để xác định nhanh chóng các cá thể con lai theo mục tiêu mong muốn.

Phân tích bản đồ QTL

Bảng 1: Thông tin chi tiết trên 12 nhiễm sắc thể

| Nhiễm sắc thể | Số marker | Chiều dài (cM) | Trung bình |
|---------------|-----------|----------------|------------|
| 1 | 24 | 355,5 | 14,81 |
| 2 | 25 | 327,0 | 13,08 |
| 3 | 19 | 221,8 | 11,67 |
| 4 | 18 | 187,9 | 10,43 |
| 5 | 17 | 183,2 | 10,77 |
| 6 | 20 | 120,9 | 6,04 |
| 7 | 18 | 189,0 | 10,50 |
| 8 | 17 | 180,9 | 10,64 |
| 9 | 20 | 290,4 | 16,13 |
| 10 | 15 | 133,3 | 8,88 |
| 11 | 18 | 177,2 | 9,84 |
| 12 | 21 | 186,6 | 8,88 |
| Tổng cộng | 232 | 2.553,7 | 10,97 |

Dựa vào 234 chỉ thị phân tử SSR phủ trên 12 nhiễm sắc thể, bản đồ liên kết được ghi nhận, với 126 marker đa hình. Chiều dài tổng số phủ trên toàn bộ 12 nhiễm sắc thể là 2.553,7cM, khoảng cách trung bình giữa hai marker là 10,97cM. Khoảng cách trung bình trên nhiễm sắc thể 12 là 12,50cM (ngắn nhất), trên nhiễm sắc thể số 3 là 66,33cM (dài nhất) (bảng 1). Có nhiều quãng thiếu nằm trên nhiễm sắc thể số 6 cần được bổ sung thêm, trong khi hoàn chỉnh bản đồ sau này.

Phân tích QTL tính chống chịu điều kiện khô hạn

Phân tích QTL marker theo phương trình tuyến tính theo phương pháp Tinker (1996). Điện di trên agarose gel, các băng đa hình không thể hiện rõ giữa các cá thể. Đa hình giữa bố mẹ và con lai liên kết với marker mục tiêu được đánh giá (Nguyễn 2002). Bốn tính trạng mục tiêu có

liên quan đến chống chịu khô hạn là X_1 : mức độ khô lá và héo lá, X_2 : chiều dài của rễ tương đối, X_3 : tỉ lệ thụ phấn, X_4 : năng suất hạt / khóm lúa.. Tính trạng số lượng này bị ảnh hưởng rất lớn bởi môi trường, do đa gen điều khiển. Markers liên kết với tính chống chịu hạn chủ yếu trên nhiễm sắc thể số 1, 3, 8, 9, và 12. Phân tích QTL thông qua phép thử χ^2 , phân tích marker đơn (SMA), lập bản đồ cách quãng (IM), LOD score ≥ 3 .

Ảnh hưởng QTL và hoạt động của gen điều khiển chịu hạn

Khả năng phát hiện QTL tùy thuộc vào điều kiện có thể được của marker loci, sự kết hợp trong phân tích thống kê giữa những alen tại các loci của marker phân tử và những alen tại các loci có tính chất số lượng (QTL). Tần suất biến thiên của tính trạng DRR trong phân bố chuẩn. Locus RM201 trên nhiễm sắc thể số 9, được xác định liên kết chặt chẽ với tính trạng mục tiêu DRR, với giá trị $R^2 = 20,73\%$. Kết quả này phù hợp với kết quả của Steel và ctv. (2006).

Đối với tính trạng chiều dài của rễ, biến thiên của kiểu hình được giải thích thấp hơn 5,01 % tại locus RM189 và 23,80% tại locus RM316 trong tổ hợp lai OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-HB. Trong quần thể OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-HB, biến thiên này được giải thích chủ yếu tại locus RM189

Ở tổ hợp lai OM1490 / WAB881 SG9, biến thiên của kiểu hình được giải thích bởi quãng giữa RM201-RM238 là 32,28%, rất đáng chú ý. Quãng giữa này đều được ghi nhận trong cả hai quần thể của OM1490 / WAB880-1-38-18-20-P1-HB và OM1490 / WAB881 SG9

Các tính trạng năng suất và tỉ lệ hạt thụ tinh chưa ghi nhận được kết quả liên kết giữa QTLs và tính trạng trong cả ba tổ hợp lai nói trên

Thực hiện fine mapping

Tổng số 229 cây BC_2F_2 của OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-HB đã được dùng để thiết lập bản đồ chống chịu điều kiện khô hạn giai sau khi cấy 30 ngày. Sử dụng 20 microsatellite marker đa hình phục vụ cho phân tích. Marker đa hình nghiêng lệch về bố chiếm tỉ lệ 20,5%. Điều này khá thuận lợi khi phân tích và đánh giá kiểu gen cho chọn giống chống chịu điều kiện khô hạn. Nhiễm sắc thể (NST) mục tiêu là NST số 9.

Tổng chiều dài được bao phủ bởi marker đa hình trên nhiễm sắc thể số 9 là 290,4 cM. Trung bình khoảng cách giữa hai marker là 16,13 cM, Sản phẩm PCR được khuếch đại với primer RM201 trên nhiễm sắc thể số 9, có trình tự DNA như sau

F-5'CTCGTTTATTACCTACAGTACC -3'

R-5'CTACCTCCTTTCTAGACCGATA-3'

Bảng 2: Phân tích SMA các tính trạng chịu hạn lúc trổ bông (DF), khối lượng khô của rễ (DR), chiều dài rễ (RL) của 229 dòng BC_2F_2

| Nhiễm sắc thể | Liên kết với marker | QTL | R^2 (%) | Tổ hợp lai |
|---------------|---------------------|-----|-----------|--------------------------------|
| 2 | RM212 | DR | 30,76 | OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-HB |
| 2 | RM 201 | RL | 4,91 | OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-H |
| 3 | RM 189 | RL | 5,01 | OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-H |
| 4 | RM 201 | DR | 9,95 | OM4495/IR65195-3B-2-2-2-2 |

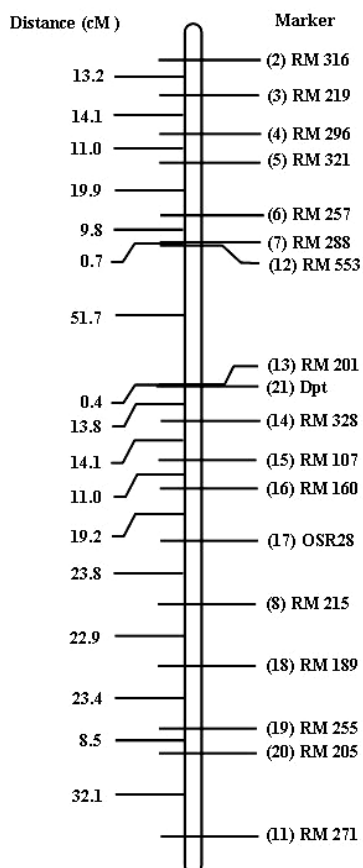
| | | | | |
|----|--------|----|-------|-------------------------------|
| 4 | RM273 | DF | 6,23 | OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-H |
| 8 | RM344 | DF | 4,26 | OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-H |
| 10 | RM271 | DF | 5,33 | OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-H |
| 6 | RM 316 | DR | 23,80 | OM1490/ WAB 881 SG 9 |

Bảng 3. Phân tích IMA các tính trạng chịu hạn lúc trổ bông (DF), khối lượng khô của rễ (DR), chiều dài rễ (RL) của 229 dòng BC₂F₂

| NST | Quãng giữa hai marker | QTL | R ² (%) | Quần thể | Chọn lựa marker |
|-----|-----------------------|-----|--------------------|--------------------------------|-----------------|
| 1 | RM201-RM328 | DR | 20,73 | OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-HB | RM201 |
| 5 | RM201-RM328 | DR | 32,38 | OM1490/ WAB 881 SG 9 | RM201 |
| 12 | RM155-RM511 | DF | 3,39 | OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-HB | RM155 |

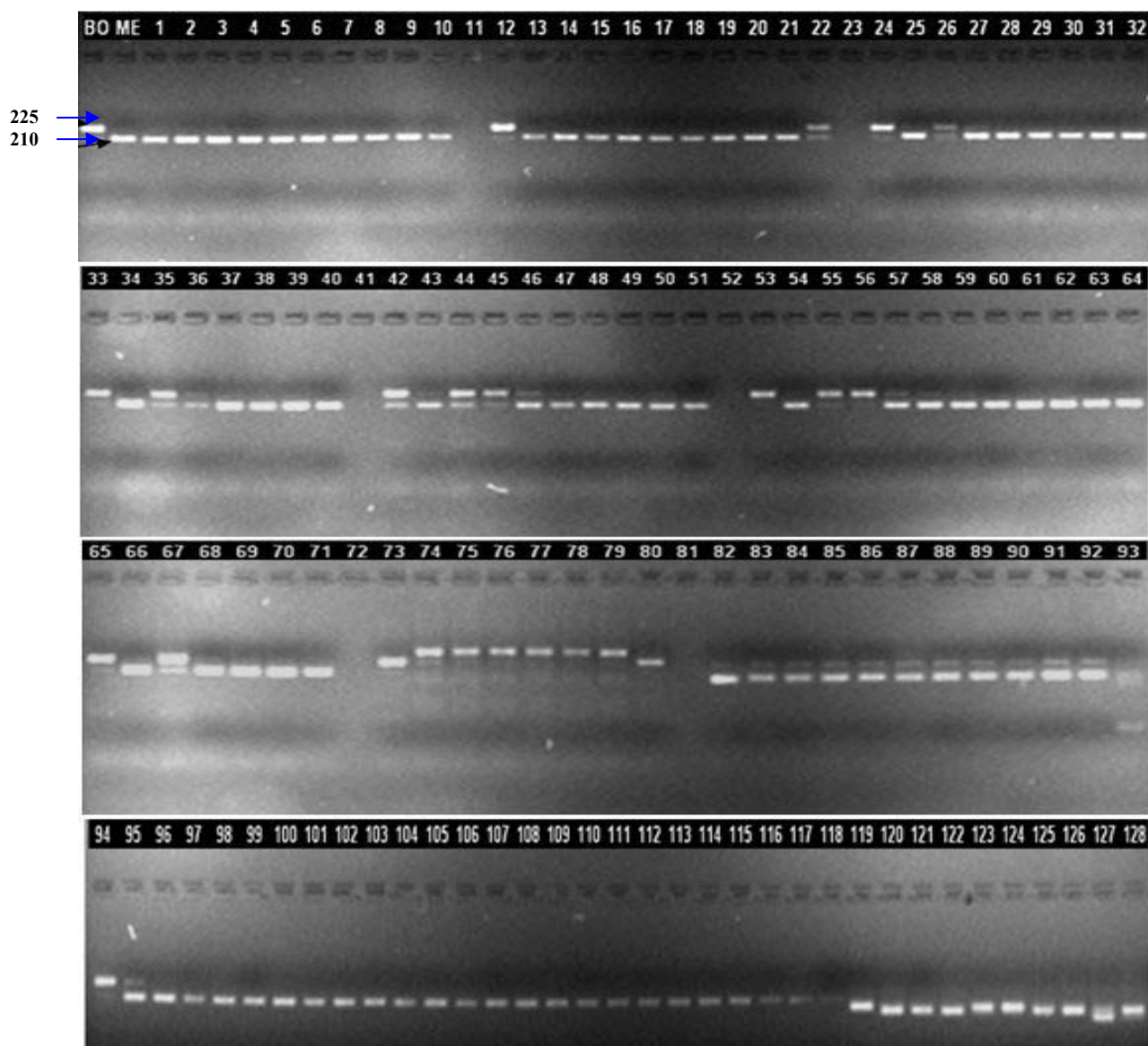
Tính chất đa hình của quần thể phân ly tại locus RM201 trên nhiễm sắc thể số 9, với băng của bố ở vị trí 225 bp, và băng của mẹ ở vị trí 210 bp (hình 1 và 2)

Map 9



Hình 1. Bản đồ có tính chất “fine mapping” của gen điều khiển tính trạng chống chịu khô hạn trên nhiễm sắc thể số 9, của quần thể BC₂F₂ (OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-HB)

QTLs liên quan đến khối lượng khô của rễ liên kết với marker đã giải thích biến thiên kiểu hình 32,28%, 20,73% và 9,95%, tương ứng với các cặp lai OM1490/WAB881 SG9, OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-HB và OM4495/IR65195-3B-2-2-2-2. Đối với tính trạng chiều dài của rễ, QTL liên kết với marker RM189 giải thích 5,01 % biến thiên kiểu hình (OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-H); và QTL liên kết với marker RM136 giải thích được 23,80% (OM1490/WAB881 SG9).



Hình 2: Điện di trên agarose gel tại locus RM201 trên nhiễm sắc thể số 9 cho thấy mức độ đa hình của BC₂F₂ thuộc tổ hợp lai OM1490 / WAB880-1-38-18-20-P1-HB

IV. Kết luận

- ❖ Trong phân tích các cặp lai đơn và hồi giao đều ghi nhận khả năng chống chịu khô hạn khá tốt của cá thể con lai trong tổ hợp lai BC₂F₂

- ❖ Biến thiên kiểu hình được giải thích bởi liên kết giữa QTL mục tiêu và marker RM201 là 32,28%, 20,73% và 9,95%, theo thứ tự đối với cặp lai OM1490 / WAB881 SG9, OM1490/WAB880-1-38-18-20-P1-HB và OM4495 / IR65195-3B-2-2-2-2. Đối với tính trạng chiều dài của rễ, kết quả này biểu hiện thấp hơn 5,01 % tại locus RM189 đối với OM1490 / WAB880-1-38-18-20-P1-H. và tại locus RM316 kết quả đạt 23,80% đối với OM1490 / WAB881 SG9.
- ❖ Nhìn chung tại locus RM201 của nhiễm sắc thể số 9, cả 3 quần thể con lai được nghiên cứu đều cho kết quả đa hình đáng tin cậy. Do đó, RM201 được đề nghị sử dụng cho nội dung chọn tạo giống lúa chống chịu khô hạn nhờ chỉ thị phân tử (MAS)

Lời cảm ơn: Tập thể tác giả cảm ơn Bộ NN và PTNT đã cấp kinh phí cho đề tài này được tiến hành

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bake J, C Steele, LI Dure. 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11:277-291
- Bray EA, J Bailey-Serres, E Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, B Buchanan, R John (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 1158-1249
- Bừu BC, NT Lang. 2003. Cơ sở di truyền tính chống chịu đối với thiệt hại do môi trường của cây lúa. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, TP Hồ chí Minh. 223 pp.
- Bừu BC. 2005. Báo cáo Bộ Trưởng. Hội nghị quốc tế lần thứ năm về di truyền cây lúa tại Philippines. Viện Lúa ĐBSCL (báo cáo hàng năm). 15 p. (www.clrri.org)
- Cumming AC. 1999. LEA protein. In Shewry PR, R Casey (eds) *Seed proteins*. Kluwer, Dordrecht, pp 753-780
- Dure LIII, M Crouch, J Harada, T-H Ho, J Mundy, RS Quatrano, T Thomas, ZR Sung. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* 12:475-486
- Garay-Arroyo A, JM Colmenero, A Garcarrubio, AA Covarrubias. 2000. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol Chem* 275:5668-5674
- Garg AK, JK Kim, TG Owen, AP Ranwala, YD Choi, LV Koichian, RJ Wu. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15898-15903
- Goyal K, LJ Walton, A Tunnacliffe. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* 388:151-157
- Grelet J, A Benamar, E Teyssier, MH Avelange-Macherel. 2005. Identification in pea seed mitochondria of late embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol* 137: 157-167
- Hayashi H, Alia, L Mustardy, P Deshniem, M Ida, N Murata. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J* 12:133-142
- Hoisington D, C Jiang, M Khairallah, JM Ribault, M Bohn, A Melchinger, M Willcox, D Gonzalez-de-Leon. 1996. QTL for insect resistance and drought tolerance in tropical maize: prospects for marker-assisted selection. *Sym Soc Exp Biol* 50:39-44
- Ingram J, D Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377-403
- Karaba A, S Dixit, R Greco, A Aharoni, KR Trijatmiko, N Marsch-Martinez, A Krishnan, KN Nataraja, M Udayakumar, A Pereira. 2007. Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *PNAS* 1-6 (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707294104)
- Kishor P, Z Hong, GH Miao, C Hu, D Verma. 1995. Over-expression of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* 108:1387-1394
- Lander ES, P Green, J Abrahamson, A Barlow, MJ Daly, SE Lincoln, L Newburg. 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.

- Lilley JM, MM Ludlow, SR McCouch, JC O'Toole. 1996. Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot* 47:1427-1436
- Maqbool B, H Zhong, Y El-Maghraby, A Ahmad, B Chai, W Wang, R Sabzikar, B Sticklen. 2002. Competence of oat (*Avena sativa* L.) shoot apical meristems for integrative transformation, inherited expression, and osmotic tolerance of transgenic lines containing *hva1*. *Theor Appl Genet* 105:201-208
- Milan MAR, DA Aswey, HR Boerma. 1998. An additional QTL for water-use-efficiency in soybean. *Crop Sci.* 38:390-393
- Ndong C, J Danyluk, KE Wilson, T Huner NP, F Sarhan. 2002. Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins: molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol* 129:1368-1381
- Nguyễn Thị Lang 2002. Những phương pháp cơ bản trong công nghệ sinh học. Nhà Xuất bản Nông Nghiệp TP Hồ Chí Minh 200 trang
- Nguyễn thị Lang và Bùi Chí Bửu. 2004. Nghiên cứu di truyền gen kháng mặn trên quần thể trồng đòng của cây lúa. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn* (6): 824-826)
- Quarries S, V Lazic-Jancic, M Ivanovic, C Pekic, A Heyl, P Landi, C Lebreton, A Steed. 1997. Molecular marker methods to dissect drought tolerance in maize. In: Tsafaris A, editor. *Genetics, biotechnology and breeding of maize and sorghum*. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry. P. 52-58
- Raynal M, J Guillemot, C Guyguen, R Cooker, M Delseny, V Gruber. 1999. Structure, organization and expression of two closely related novel *Lea* (late embryogenesis abundant) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 40:153-165
- Shen B, RG Jensen, HJ Bohnert. 1997. Increase resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol* 113:1177-1183
- Shen L, B Courtois, K McNally, SR McCouch, Z Li. 1999. Developing near-isogenic lines of IR64 introgressed with QTLs for deeper and thicker roots through marker-aided selection. In: *Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments*. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 275-289
- Soltis DE, PS Soltis. 2003. The role of phylogenetics in comparative genomics. *Plant Physiol* 132:1790-1800
- Steele KA, AH Price, HE Shashidhar, JR Witcome. 2006. Marker assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into an indian upland rice varieties.
- Thomashow MF. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* 118:1-8
- Thomashow MF. 1999. *Plant Cold Acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571-599
- Wang H, H Zhang, F Gao, J Li, Z Li. 2007. Comparison of gene expression between upland rice cultivars under water stress using cDNA microarray. *TAG* 115:1109-1126
- Wise. 2003. Leaping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics* 4:52
- Xiao B, Y Huang, N Tang, L Xiong. 2007. Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *TAG* 115:35-46
- Xiong L, KS Schumaker, JK Zhu. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14 (Suppl):S165-183
- Xu D, X Duan, B Wang, B Hong, T Ho, R Wu. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110:249-257
- Xu JL, HR Lafitte, YM Gao, BY Fu, R Torres, and Z Kang. 2005. QTLs for drought escape and tolerance identified in a set of random introgression lines of rice. *Theor Appl Genet* (2005) 111:1642-1650
- Zhang J, HG Zheng, ML Ali, JN Triparthu, A Aarti, MS Pathan, AK Sarial, S Robin, Thuy Thanh Nguyen, RC Babu, Bay duy Nguyen, S Sarkarung, A Blum, Henry T Nguyen. 1999. Progress on the molecular mapping of osmotic adjustment and root traits in rice. In: *Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments*. (Eds.) O Ito, JC O'Toole, and B Hardy. IRRI, Philippines. P. 307-317
- Zhang X, S Zhou, Y Fu, Z Su, X Wang, C Sun. 2006. Identification of a drought tolerant introgression line derived from Dongxiang common wild rice (*O. rufipogon* Griff.). *Plant Mol Biol* 62:247-259
- Zhao SH, FZ Wang, L Lu, HY Zhang, XY Zhang. 2000. Breeding and selection of drought resistant and salt tolerant wheat variety Cang 6001. *Acta Agric Boreall Sin* 15:113-117